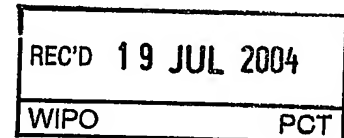




별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

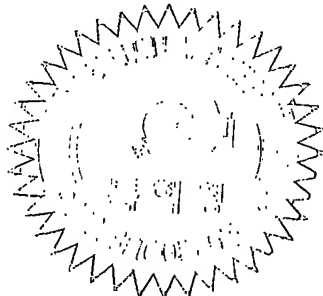
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.



출원번호 : 10-2003-0040535
Application Number

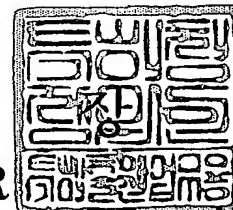
출원년월일 : 2003년 06월 23일
Date of Application JUN 23, 2003

출원인 : 주식회사 엔바이오테크놀로지
Applicant(s) EN-BIO TECHNOLOGY CO., LTD.



2004 년 06 월 23 일

특 허 청
COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.06.23
【발명의 명칭】	독감 인플루엔자 바이러스 및 전염성 위장염 코로나 바이러스 억제 활성을 갖는 효모변이주 아이에스2 유래 수용성 글루칸 올리고머를 함유하는 조성물
【발명의 영문명칭】	Composition comprising soluble glucan oligomer from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IS2 inhibiting the swine influenza (SIV) and transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) virus
【출원인】	
【명칭】	주식회사 엔바이오테크놀러지
【출원인코드】	1-2000-015825-7
【대리인】	
【성명】	신동인
【대리인코드】	9-2000-000156-1
【포괄위임등록번호】	2002-082819-1
【발명자】	
【성명】	문원국
【출원인코드】	4-2002-042164-9
【발명자】	
【성명】	김동우
【출원인코드】	4-1998-603002-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정봉현
【성명의 영문표기】	CHUNG, Bong Hyun
【주민등록번호】	591112-1038027
【우편번호】	302-280
【주소】	대전광역시 서구 월평동 누리아파트 113-607
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박정훈
【성명의 영문표기】	PARK, Jeong Hoon

【주민등록번호】 671007-1574518
【우편번호】 305-752
【주소】 대전광역시 유성구 송강동 송강청솔아파트 514-1302
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 신동인 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 10 면 10,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 6 항 301,000 원
【합계】 340,000 원
【감면사유】 소기업 (70%감면)
【감면후 수수료】 102,000 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 소기업임을 증명하는 서류_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 독감 인플루엔자 바이러스(swine influenza virus; SIV) 및 전염성위장염 코로나 바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV)를 억제하는 효모 변이주 IS2(KCTC0959BP) 유래의 수용성 글루칸 올리고머(soluble glucan oligomer)에 관한 것으로, 본 발명에 의해 생산된 수용성 글루칸 올리고머는 독감 인플루엔자 바이러스를 억제하며, 전염성 위장염(TGEV) 코로나바이러스의 생육을 효과적으로 억제하는 효과가 있음을 확인함으로써, 본 발명의 수용성 글루칸 올리고머는 독감으로 인한 질환 및 코로나바이러스와 관련된 질환 치료 또는 예방을 위한 의약품 및 건강기능식품에 이용될 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

효모 변이주 IS2, 베타글루칸, 수용성 글루칸 올리고머, 독감 인플루엔자 바이러스(SIV), 전염성 위장염(TGEV) 코로나 바이러스

【명세서】

【발명의 명칭】

독감 인플루엔자 바이러스 및 전염성 위장염 코로나 바이러스 억제 활성을 갖는 효모변이주 아이에스2 유래 수용성 글루칸 올리고머를 함유하는 조성물 {Composition comprising soluble glucan oligomer from *Saccharomyces cerevisiae* IS2 inhibiting the swine influenza (SIV) and transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) virus}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 수용성 글루칸 올리고머 처치군과 비처리군간의 폐포대식구에서의 NO 발생량 비교를 나타낸다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<2> 본 발명은 수용성 글루칸 올리고머를 함유하는 인플루엔자 바이러스 및 코로나바이러스로 인한 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 돼지 독감 인플루엔자 바이러스(swine influenza virus; SIV) 및 돼지 전염성위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV)를 억제하는 효모 돌변주 IS2(KCTC0959BP) 유래의 수용성 글루칸 올리고머(soluble glucan oligomer)를 함유하는 약학조성물에 관한 것이다.

<3> 독감 바이러스는 매년 전세계적으로 발생하여 호흡기 질환을 일으키는데, 이 질환은 면역 능력이 약한 어린이와 노인들에 대해 치사율이 높고, 합병증으로 폐렴(pneumonia), 심폐질환(cardiopulmonary disease) 등의 기관지 질환들을 수반하는 경우 치사율이 더욱 높아져 국민 보건에 미치는 영향이 크다고 할 수 있다. 특히 1918년에 약 200만명의 사상자를 낸 스페인 독감 바이러스(Epidemic and Peace 1918, Greenwood press, 145-170. 1976), 1957년 아시아 바이러스(H2N2)와 같이 10내지 20년 주기로 전세계적으로 출현하는(pandemic) 독감 바이러스는 매우 치명적인데, 1968년대의 홍콩 독감 바이러스(H3N2) 이후 이러한 독감 바이러스가 발생하지 않았다는 점을 고려하면, 가까운 미래에 치명적인 독감 바이러스의 출현이 예상되고 있다. 한편 독감으로 인한 손실되는 비용 또한 엄청나며, 세계보건기구(WHO)에서는 바이러스의 출현 감시를 매년 초에 유행할 독감 바이러스를 발표한다. 이러한 독감 바이러스를 치료하기 위한 백신의 제조는 70-80%의 예방 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있으나(Influenza, Plenum Medical Book Company, p291, 1987), 이러한 백신은 성인에게서 면역 지속기간이 짧으며, 주사제이므로 어린이에게 투여하는데 애로사항 및 초기발병 감염 저지 또한 어려운 여러 가지의 문제점을 많이 안고 있다.

<4> 인플루엔자는 상기도 통증, 두통 및 복통과 더불어, 열, 한기 및 근육 쇠약 및 통증을 유발하고, 이 인플루엔자 감기는 인플루엔자 믹소바이러스 (mixovirus)의 여러 형태 즉, A형, B형 및 C₄ 형 바이러스 및 코로나 바이러스에 의해 기인된다. 이러한 인플루엔자 바이러스들은 유사한 증상을 나타내지만 완전히 서로 다른 항원을 갖고 있어 하나의 형태의 바이러스에 의한 감염은 그 외의 다른 형태의 바이러스들에 대해서는 면역성을 갖고 있지 않게 된다.

- <5> 2003년 초 전세계에 출현한 유행전염병인 중증 급성호흡기 증후군(SARS, severe acute respiratory syndrome)의 병원균 정체는 코로나 바이러스로 알려졌으며, 동물의 코로나바이러스가 돌연변이를 일으켜 사람에게 감염된 것으로 알려져 있다.
- <6> 이 코로나 바이러스는 국내, 외 돼지 사육 현장에서 발생하는 중요한 전염성위장염, 일종의 설사병의 원인 바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV)로써, 포유 자돈의 80~90%, 자돈의 20%이상을 폐사시키며, 육성돈과 성돈에서는 식욕을 감퇴시켜서 성장을 저해시킨다. 이러한 질병은 양돈장 및 자연환경에 서식하는 코로나바이러스에 의해서 일어나며, 또한 이 바이러스는 전염성이 강하여 그 폐해가 더욱더 증가하고 있는 실정이다.
- <7> 코로나바이러스는 돼지 전염성위장염, 설사증 등의 증상을 통해 가축을 포함한 동물 및 사람 등에 영향을 미치므로, 항생제를 투여하더라도 코로나바이러스에 대한 치료 효과를 볼 수 없으며 단지 2차 감염을 일으키는 미생물에 대한 치료 효과만 기대할 수 있다. 또한 인체 내에서의 감염은 아직까지 치료법이 개발되고 있지 않은 상황이다. 또한 돼지에서는 전염성위장염(TGE) 코로나바이러스의 감염 예방을 위해 백신이 사용되고 있으나 백신 사용에 의한 부작용이 발생할 수 있다는 문제점이 제기되고 있다.
- <8> 한편, 본 발명의 베타-글루칸은 효모뿐만 아니라 미생물, 버섯, 곡류, 조류 등으로부터 분리되어 다양한 형태의 제품으로 사용되고 있으며, 특히 효모세포벽 유래의 베타-글루칸이 가장 잘 연구되어 있다. 효모는 미국 FDA에서 GRAS (Generally Recognized As Safe)로 분류되어 식품 및 다양한 분야에서 사용되는 미생물로서 세포내측은 주성분의 베타 1,3 과 1,6 글루칸, 및 소량의 키틴과 만노단백질(mannoprotein)로 구성되어 있으며, 외측은 만난(mannan)이 단백질과 연결되어 있는 만노단백질로 이루어진 세포벽을 가지고 있다. 효모세포벽의 주성분인 베타

타글루칸은 대식세포의 활성화와 증식촉진에 따른 항원 특이적 면역반응 증가가 보고되고 있으며 진균, 세균, 바이러스 등의 다양한 감염원에 대한 저항성을 높이는 것이 증명되었고, 외상 시 관찰되는 면역기능 저하도 억제하는 것으로 보고되며, 또한 숙주의 암 또는 암의 전이에 대한 저항성도 증가시키는 것으로 알려져 있다(Abel, G. and Czop, J. K., , 14, pp1363-1373, 1992; Babineau, et al., 220(5), pp601-609, 1994; Benach J. L., et al., *Infection and Immunity*, 35(3), pp947-951, 1982; Di Renzo, L., et al., *Eur. J. Immunol.*, 21, pp1755-1758, 1991; Fukase, S., et al., *Cancer Res.*, 47, pp4842-4847, 1987; Janusz, M. J., et al., *J. Immun.*, 142, pp959-965, 1989; Olsen, E, J., et al., *J. Immun.*, 64, pp3548-3554, 1996, Sakurai, T., et al., *Int. J. Immunopharmacol.*, 14, pp821-830, 1992; Czop, J. K., et al., *Prog. Clin. Biol. Res.*, 297, pp287-296, 1989).

<9> 그러나, 현재까지 수용성 글루칸이 인플루엔자바이러스 및 코로나바이러스의 증식을 억제한다고 알려지거나 개시된 바 없다.

<10> 이에, 본 발명자는 효모변이주 IS2의 세포벽으로부터 불용성 베타글루칸을 추출한 후, 베타글루칸 분해효소를 처리하여 수득된 분자량이 1,000에서 10,000사이의 수용성 글루칸 올리고머가 돼지 독감 인플루엔자 바이러스(swine influenza virus; SIV) 및 돼지 전염성위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV)의 억제에 탁월한 효능을 보임을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <11> 본 발명은 효모 변이주 IS2(KCTC 0959BP)로부터 수용성 글루칸 올리고머를 함유하는 독감 인플루엔자 바이러스 및 코로나 바이러스로 인한 질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

【발명의 구성】

- <12> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 효모변이주(KCTC 0959BP) 세포벽 유래의 불용성 베타-글루칸을 효소로 처리하여 수득된 수용성 글루칸 올리고머를 함유하는 독감 인플루엔자 바이러스 및 코로나 바이러스로 인한 질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.
- <13> 상기 독감 인플루엔자 바이러스는 A형, B형, C₄형 인플루엔자 바이러스를 포함하며, 돼지인플루엔자 바이러스도 이에 속한다. 이로 인해 발생하는 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염 및 폐렴 등을 포함한다.
- <14> 상기 코로나 바이러스로 인한 질환은 감기, 중증 급성 호흡기 질환, 급성유행성설사, 전염성 위장염 등을 포함한다.
- <15> 또한, 상기 질환은 사람을 포함한 포유동물에 발생하는 질환을 의미한다.
- <16> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- <17> 본 발명의 효모유래 수용성 글루칸 올리고머는, (a) 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*) 변이주 IS2(KCTC 0959BP)를 접종용 액체배지에서 배양하는 제 1단계; (b) 상기 효모배양액을 액체배지에 접종하여 유가배양한 후 원심분리로 효모를 수득하는 제 2 단계; (c) 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 효모 IS2 세포벽으로부터 베타글루칸을 추출하는 제 3 단계; (d) 추출한 베타

타글루칸을 베타-글루칸 분해효소와 반응시킨 후 여과하여 수용성 글루칸 올리고머를 생산하는 제 4 단계; 및 (e) 상기 수용성 글루칸 올리고머를 동결건조하여 건조분말을 수득하는 제 5 단계로 이루어진 공정을 통하여 제조될 수 있다.

<18> 더욱 상세하게는 본 발명의 효모 유래 수용성 글루칸 올리고머는,

<19> (a) 효모 IS2(KCTC 0959BP)를 포도당 0.5 내지 10 w/v%, 효모추출물 0.1 내지 5 w/v% 및 펩톤 0.1 내지 10 w/v%을 함유하는 접종용 액체배지에서 배양하는 제 1 단계; (b) 상기 1단계의 효모배양액을 접종원으로 포도당 0.5 내지 10 w/v%, 효모추출물 0.1 내지 5 w/v%, 황산암모늄 0.01 내지 2w/v%, 이인산칼륨 0.001 내지 1 w/v% 및 황산마그네슘 0.001 내지 1 w/v%를 함유하고, pH가 5.0 내지 6.0인 초기 액체배지에 0.1 내지 10%(v/v)의 양으로 접종한 후, 온도 30℃, 회전수 100 내지 400rpm, 통기량 0.3 내지 3vvm의 조건으로 12시간 내지 48시간동안 배양하면서, 포도당 0.5 내지 10 w/v%, 효모추출물 0.1 내지 5 w/v%, 황산암모늄 0.01 내지 2w/v%, 이인산칼륨 0.001 내지 1 w/v% 및 황산마그네슘 0.001 내지 1 w/v%을 함유하는 성장배지를 사용하여 유가배양한 후, 원심분리하여 효모를 수득하는 제 2 단계; (c) 상기 제 2단계에서 수득한 효모에 1 내지 10%의 수산화나트륨 용액을 첨가하여 분산시키고, 70 내지 100℃에서 30분 내지 5시간동안 반응시킨 다음 원심분리하여 고형성분을 수득하는 과정을 1회 내지 5회 반복수행한 후, 수득된 고형성분을 염산 및 황산과 같은 강산을 사용하여 pH 4.0 내지 5.0이 되도록 적정하고, 다시 수산화나트륨 용액에 분산시킨 후, 다시 75℃에서 1시간동안 반응시킨 후 원심분리하여 수산화나트륨 용액과 고형성분을 분리하고, 고형성분을 1회 내지 5회에 걸쳐 증류수로 세척하여 효모 IS2 세포벽으로부터 함수 베타글루칸을 추출하는 제 3단계; (d) 상기 제 3단계에서 추출한 함수 베타글루칸에 1배 내지 10배의 증류수 및 함수 베타글루칸 무게의 1/20 내지 1/5 부피에 해당하는 베타글루칸 분해효소를 첨가한 후, 30 내지 80℃에서 6 내지

24시간 반응시킨 후, 반응이 종료되면 원심분리하여 상등액을 회수하고, 회수한 상등액을 한 외여과막에서 걸러, 50,000 이하의 분자량을 가지는 글루칸 올리고머만을 포함하는 액상을 수득하는 제 4단계; 및 (e) 얻어진 액상을 -70°C 이하에서 12시간 내지 48시간 방치한 후, 동결 건조하여 수용성 글루칸 올리고머 건조분말을 수득하는 제 5단계로 이루어진 제조공정을 포함하는 제조방법에 의해 수득될 수 있다.

- <20> 상기에 의해 제조된 효모 변이주(KCTC 0959BP) 유래 수용성 글루칸 올리고머는 분자량이 50,000 이하이고, 바람직하게는 분자량이 1,000 내지 10,000이다.
- <21> 본 발명은 상기 제법으로 제조된 효모 IS2 (KCTC 0959BP) 유래 수용성 글루칸 올리고머를 유효성분으로 함유하는 독감 인플루엔자 및 코로나 바이러스에 의한 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- <22> 본 발명의 약학조성물은 인간 또는 개, 고양이, 소, 돼지 등의 가축에 투여가능하고 가축에 사용시에는 사료에 혼합하는 등의 당업계에 통상적인 투여방법으로 사용이 가능하다.
- <23> 추가적으로, 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 수용성 글루칸 올리고머를 함유하는 약학조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 수용성 글루칸 올리고머를 0.1 내지 50 중량%로 포함한다.
- <24> 본 발명의 수용성 글루칸 올리고머를 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- <25> 본 발명의 수용성 글루칸 올리고머의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 분획물과 결합 뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

<26> 본 발명에 따른 수용성 글루칸 올리고머를 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 수용성 글루칸 올리고머를 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 수용성 글루칸 올리고머에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- <27> 본 발명의 수용성 글루칸 올리고머의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 0.01 내지 500mg/kg의 양, 바람직하게는 0.1 내지 100mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 또한 그 수용성 글루칸 올리고머의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <28> 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- <29> 본 발명의 수용성 글루칸 올리고머를 포함하는 조성물은 독감 인플루엔자 및 코로나 바이러스 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 수용성 글루칸 올리고머를 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.
- <30> 본 발명의 수용성 글루칸 올리고머 자체는 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- <31> 또한 본 발명의 수용성 글루칸 올리고머는 기타 식품의 주, 부원료 및 식품첨가제로서 사용이 가능하다.
- <32> 또한 본 발명은 수용성 글루칸 올리고머 및 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함하는 독감 인플루엔자 및 코로나 바이러스를 억제하거나 상기 바이러스에 의한 질환을 예방 또는 개선을 위한 건강기능성식품을 제공한다.

- <33> 본 발명의 상기 수용성 글루칸 올리고머는 인플루엔자 바이러스 및 코로나 바이러스로 인한 질환의 예방을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다.
- <34> 본 발명의 건강 음료 조성물은 필수 성분으로서 상기 수용성 글루칸 올리고머를 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- <35> 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- <36> 본 발명은 다음의 실시예 및 실험예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명이 이에 의해 제한되지는 않는다.

<37> 실시예 1. 효모변이주 IS2의 배양 및 수확

<38> 초기배지는 포도당(glucose) 10 g/ℓ, 효모추출물(yeast extract) 6 g/ℓ, 황산암모늄 $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ 3 g/ℓ, 이인산 칼륨(K_2HPO_4) 1.5 g/ℓ, 황산마그네슘 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5 g/ℓ의 조성을 가진 액체배양액을 사용하였다.

<39> 접종을 위한 접종원의 배양액은 액상 YPD 배지(포도당 20 g/ℓ, 효모추출물 10 g/ℓ, 펩톤(peptone) 20 g/ℓ)를 사용하였고, 성장배지는 포도당 400 g/ℓ, 효모추출물 30 g/ℓ, 황산암모늄 40 g/ℓ, 이인산칼륨 15 g/ℓ, 황산마그네슘 5.7 g/ℓ의 조성을 가진 액체배양액을 사용하였다.

<40> 성장배지 2 ℓ를 5 ℓ 발효조에 넣어 살균한 후, 효모변이주 IS2(KCTC 0959BP) 접종원(seed) 100 ml을 접종하고, 회전속도 300 rpm, 통기량 1 vvm, 배양온도 30℃, pH 5.5에서 회분식으로 배양한 후, 성장배지를 공급하는 유가배양을 통해 50-55 g/ℓ에 해당하는 효모균체(DCW, dried cell mass)를 수득하였다.

<41> 실시예 2. 효모변이주 IS2로부터 베타글루칸의 추출

<42> 상기 실시예 1에서 얻어진 효모균체 80 g을 4% 수산화나트륨(NaOH) 1,000 ml에 분산시킨 후, 95℃에서 1시간동안 반응시켰다. 2,000 rpm에서 15분동안 원심분리하여 수산화나트륨 용액과 고형성분을 분리하였다. 분리된 고형성분을 3% 수산화나트륨 용액 2,000 ml에 분산시킨 후, 75℃에서 3시간동안 반응시켰다. 2,000 rpm에서 15분동안 원심분리하여 수산화나트륨 용액과 고형성분을 분리하였다. 수확된 고형성분을 염산을 사용하여 pH 4.5가 되도록 적정하고, 최종

부피 2,000 ml에 분산시킨 후, 다시 75℃에서 1시간동안 반응시켰다. 2,000 rpm에서 15분동안 원심분리하여 수산화나트륨 용액과 고형성분을 분리하고, 고형성분을 3번에 걸쳐 증류수로 세척하여 효모변이주의 세포벽으로부터 160 g의 함수 베타글루칸(wet β -glucan)을 추출하였다.

<43> 실시예 3. 효모변이주 IS2 유래의 베타글루칸으로부터 수용성 글루칸 올리고머의 생산

<44> 상기 실시예 2에서 얻어진 160 g의 함수 베타글루칸을 1,000 ml 유리용기에 넣고 480 ml의 증류수와 함수 베타글루칸 무게의 1/10 부피에 해당하는 베타-글루칸 분해효소(β -glucanase, Novozyme사)를 첨가한 후 40℃에서 15시간 반응시켰다. 반응이 종료되면 7,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상등액만을 회수하고, 회수한 상등액을 한외여과막(Filtron사, MWCO 10K)에서 걸러, 반응시 사용했던 효소를 제거하고 10,000(dalton) 이하의 분자량을 가지는 글루칸 올리고머만을 포함하는 액상을 수득하였다. 얻어진 액상을 -74℃에서 하루 방치한 후 동결건조하여 수용성 글루칸 올리고머 파우더 5.8 g을 수확하였다.

<45> 실험예 1. 수용성 글루칸 올리고머의 폐포대식구에서의 NO 발생에 대한 효과

<46> 상기 실시예 3에서 수확된 수용성 글루칸 올리고머를 처리한 군과 처리하지 않은 폐포대식구에서 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 이용하여 폐포대식구가 분비하는 니트릭 옥사이드(nitric oxide, NO) 생산능의 차이를 비교하였다.

<47> 1-1. 세포 배양

<48> 1-3일령의 질병이 없는 건강한 자돈을 부검하여 폐장을 무균적으로 적출하였다. 폐장에서부터 PBS를 사용하여 폐포대식구를 추출하고 DMEM 배지(10% FBS, 2×항균-항진균 용액 포함)를 이용하여 75cm² 세포배양 플라스크에 폐포대식구를 부유시켰다. 이때 부유액 일부에서 RNA를 추출하여 7가지 돼지바이러스(Porcine parvovirus, Porcine circovirus type 2, Porcine circovirus type 1, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Japanese encephalitis virus, Encephalomyelocarditis virus, Pseudorabies virus)의 폐포대식구 감염유무를 확인하기 위해 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction) 검사하였다(Jabrane et al., *Can Vet J.*, 35, pp86-92, 1994). 12시간 동안 폐포대식구의 오염유무를 살피고 플레이트에 폐포대식구세포를 접종하기 전 PBS로 2회 가볍게 세척한 후 트립신-EDTA를 이용하여 폐포대식구를 플라스크 표면에서 탈락시켰다. 탈락된 폐포대식구를 24 웰 플레이트에 한 웰당 $1 \times 10^6 \sim 10^7/\text{ml}$ 이 되게 폐포대식구를 준비하였다.

<49> 1-2. NO 생산 유도

<50> 세포가 준비되면 수용성 글루칸 올리고머를 DMEM 배지로 10mg/ml이 되게 녹이고 웰당 5mg/ml부터 2 배씩 희석(2 fold-dilution)하여 0.625mg/ml까지의 농도로 웰에 접종하였다. 36시간 후 LPS (Sigma. co)를 100μg/ml부터 2 배씩 희석하여 25μg/ml까지의 농도로 웰에 접종하였다. 배양 36시간 후, 배양상층액을 수확하여 NO를 측정하였다. 음성대조군으로는 글루칸을 처리하지 않고 LPS만을 접종한 군과 글루칸과 LPS 모두 접종하지 않은 군의 배양상층액을 사용하였다. NO의 농도는 아질산염/질산염 발색 분석 키트(Nitrate/nitrite colorimetric assay kit, Cayman Chemical사)를 사용하여 측정하였다.

<51> 그 결과, 상기 실시예 3에서 수확된 수용성 글루칸 올리고머를 투여한 폐포대식구에서 글루칸을 처리하지 않은 폐포대식구보다 더욱 많은 NO가 생성되었다. NO의 양은 글루칸의 투여량에 따라 달랐으며 투여농도가 높을수록 NO의 생산이 많은 것을 알 수가 있었다. 따라서 글루칸은 폐포대식구에서 NO 생성을 촉진시키는 중요한 자극물질로 확인되었다(도 1 참조).

<52> 실험예 2. 수용성 글루칸의 돼지 독감 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효과 분석

<53> 수용성 글루칸 올리고머를 처리한 폐포대식구의 배양상층액과 글루칸을 처리하지 않은 폐포대식구의 배양상층액을 바이러스와 처리하여 세포에 접종한 후, 바이러스에 의한 세포 변성(cytopathic effect; CPE)을 관찰하여 항바이러스 효과(anti-viral effect)를 측정하였다. 또한 글루칸을 바이러스와 함께 직접 세포에 처리하여 항바이러스 효과를 측정하였다.

<54> 2-1. 바이러스 및 세포주 준비

<55> 돼지 독감 인플루엔자 바이러스(swine influenza virus)는 최근에 독감 증상이 매우 심한 육성돈 폐장에서 분리한 돼지 독감 인플루엔자 바이러스를 사용하였다. TCID₅₀ 측정 결과는 ml당 $5 \times 10^{7.5}$ TCID₅₀이었다.

<56> 항바이러스 효과 분석에 사용된 NO는 실험예 1-2를 통하여 얻은 폐포 대식 세포의 상층액을 사용하였다. 실험에 사용하는 세포는 개의 신장 유래 세포인 MDCK(Mardin-Darby Canine Kidney) 세포주를 준비(ATCC, USA)하였다.

<57> 2-2. 간접적 항바이러스 효과 측정

<58> 세포를 96 웰 플레이트에 단층으로 자라도록 배양하여 준비하였다. NO 처리군은 글루칸 (5mg/ml) 처리 상층액과 글루칸/LPS 비처리 상층액을 각각 이용하고, 음성대조군에는 각 웰에 DMEM 배지와 글루칸/LPS 비처리 상층액을 사용하였다. 바이러스는 플레이트 웰당 10^3 , 10^2 , 10^1 TCID₅₀으로 접종하였다. 바이러스 접종 24시간, 36시간 후에 바이러스에 의한 세포 변성 (cytopathic effects; CPE)을 도립 현미경(inverted microscope)을 이용하여 관찰하였으며, 그 결과를 +++ (strongest CPE), ++ (moderate CPE), + (mild CPE), - (no CPE) 4등급으로 나누어 비교하였다(Belaid et al., *J Med Virol.*, 66(2), pp229-34, 2002). 각 군마다 연속 3개의 웰에 실시하였고 그것의 평균치를 기록하였다.

<59> 【표 1】

수용성 글루칸 올리고머의 간접적 항바이러스 효과

접종 후 시간	NO 처리군						양성대조군			음성대조군		
	글루칸/LPS 처리상층액			글루칸 처리상층액								
	10 ³ *	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ²	10 ¹
24	+++	-	-	++	+	-	+++	+++	+++	-	-	-
36	++	-	-	++	+	-	+++	+++	+++	-	-	-

* TCID₅₀

***++ (strong CPE), ++ (moderate CPE), + (mild CPE), - (no CPE)

<60> 상기 표 1의 결과를 보면, NO의 생산이 가장 많았던, 글루칸과 LPS로 같이 처리한 폐포 대식구 배양액에서 채취한 상층액이 돼지 독감 인플루엔자 바이러스의 항바이러스 효과가 가장 높았다. 특히 대조군과 비교하였을 때에도 24시간에서는 가장 바이러스를 많이 투여한 군(10^3 TCID₅₀)에서도 돼지 독감 인플루엔자 바이러스에 의한 세포변성(CPE)을 약 70% 억제하는 효과가 있으며, 접종 36시간이 경과되었을 때에도 약 30%의 억제효과가 지속되는 것으로 확인되었

다. 뿐만 아니라 소량의 독감 인플루엔자 바이러스 투여군(10^2 , 10^1 TCID₅₀)에서는 접종 36시간 까지 100%의 억제 효과가 관찰되었다.

<61> 2-3. 직접적 항바이러스 효과 측정

<62> 수용성 글루칸 올리고머의 직접적인 항바이러스 효과를 알아보기 위해, 상기 실시예 3에서 제조된 글루칸을 96 웰 플레이트에 5mg/ml과 바이러스를 함께 접종하였다. 바이러스는 플레이트 웰당 10^3 , 10^2 , 10^1 TCID₅₀으로 접종하였다. 음성 대조군으로는 글루칸 단독 투여군을 두어 비교하였다. 바이러스 접종 24시간, 36시간 후에 바이러스에 의한 세포 변성(cytopathic effects; CPE)를 도립 현미경(inverted microscope)을 이용하여 관찰하였으며, 그 결과를 +++ (strongest CPE), ++ (moderate CPE), + (mild CPE), - (no CPE) 4등급으로 나누어 비교하였다. 각 군마다 연속 3 개의 웰에 실시하였고 그것의 평균치를 기록하였다.

<63> 【표 2】

수용성 글루칸 올리고머의 직접적 항바이러스 효과

접종 후 시간	글루칸/바이러스 처리군			양성대조군			음성대조군			글루칸 단독 처리군		
	10^3 *	10^2	10^1	10^3	10^2	10^1	10^3	10^2	10^1			
24	---	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
36	+	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-

* TCID₅₀

**** (strong CPE), ++ (moderate CPE), + (mild CPE), - (no CPE)

<64> 글루칸의 직접적인 항바이러스 효과를 알아보기 위해서 글루칸(5mg/ml)을 돼지 독감 인플루엔자 바이러스와 혼합하여 단층세포에 처리하였다. 글루칸 단독으로도 바이러스 접종 24시간까지 바이러스의 양에 상관없이 대조군에 비하여 100% 항바이러스 효과를 관찰했다. 또한 바이러스 접종 36시간 후에도 소량의 바이러스(10^2 , 10^1 TCID₅₀) 투여군에서는 100% 항바이러스 효과를, 다량의 바이러스(10^3 TCID₅₀) 투여군에서는 70%의 항바이러스 효과를 관찰했다.

<65> 실험예 3. 돼지 전염성 위장염바이러스의 항바이러스 효과

<66> 3-1. 바이러스 및 세포 준비

<67> 코로나 바이러스인 돼지 전염성위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus)를 사용하였다(서울대학교 수의학과 채찬희 lab, B Kim and C.Chae., *J. Comp. Path.*, 126, pp30-37, 2002). TGEV는 밀러주(Miller strain)를 사용하고 실험전 TCID₅₀(Tissue Culture Infective Dose 50)을 측정하였다. TCID₅₀ 측정 결과 ml당 1×10^6 TCID₅₀이었다.

<68> 실험에 사용하는 세포는 돼지 교환 세포를 준비(ATCC, USA)하였다.

<69> 3-2. 간접적 항바이러스 효과 측정

<70> 돼지 전염성위장염 바이러스에 대한 본 발명의 수용성 글루칸의 간접적인 항바이러스 효과를 측정하기 위해서, 상기 실시예 1-2의 폐포대식구 배양상층액을 돼지 코로나바이러스와 혼합하여 단층세포에 처리하였고, 다음 과정은 상기 실시예 2-2의 방법과 유사하게 수행하여 하기 표 3의 결과를 얻었다.

<71> 【표 3】

수용성 글루칸 올리고머의 간접적 항바이러스 효과

접종후 시간	NO 처리군						양성대조군			음성대조군		
	글루칸/LPS 처리상층액			글루칸 처리상층액								
	10 ³ *	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ²	10 ¹
24	+++	+	+	++	+	+	+++	+++	+++	-	-	-
36	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	-	-	-

* TCID₅₀
 **+++ (strong CPE), ++ (moderate CPE), + (mild CPE), - (no CPE)

<72> NO의 생산이 가장 많았던 글루칸과 LPS로 같이 처리한 폐포대식구 배양액에서 채취한 상층액이 돼지 코로나바이러스의 항바이러스 효과가 가장 높았다. 특히 대조군과 비교하였을 때에도 24시간에서는 가장 바이러스를 많이 투여한 군(10³TCID₅₀)에서도 돼지 코로나바이러스에 의한 세포변성(CPE)을 약 70% 억제하는 효과가 있으며, 접종 36시간이 경과되었을 때에도 바이러스를 많이 투여한 군(10³TCID₅₀)에서 약 30% 억제효과가 지속되는 것으로 확인되었다.

<73> 3-3. 직접적 항바이러스 효과 측정

<74> 돼지 전염성위장염 바이러스에 대한 본 발명의 수용성 글루칸의 직접적인 항바이러스 효과를 측정하기 위해서, 글루칸(5mg/ml)을 돼지 코로나바이러스와 혼합하여 단층세포에 처리하였고, 다음 과정은 상기 실시예 2-3의 방법과 유사하게 수행하여 하기 표 4의 결과를 얻었다.

<75> 【표 4】

수용성 글루칸 올리고머의 직접적 항바이러스 효과

접종후 시간	글루칸/바이러스 처 리군			양성대조군			음성대조군			글루칸 단독 처리군		
	10 ³ *	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ²	10 ¹			
24	+++	+	+	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
36	++	++	+	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-

* TCID₅₀
 **+++ (strong CPE), ++ (moderate CPE), + (mild CPE), - (no CPE)

<76> 글루칸 단독으로도 바이러스 접종 24시간까지 가장 바이러스를 많이 투여한 군(10³TCID₅₀)에서도 약 70% 항바이러스 효과를 관찰했다. 또한 바이러스 접종 36시간 후에도 다량의 바이러스(10³, 10²TCID₅₀) 투여군에서는 약 30% 항바이러스 효과를, 소량의 바이러스(10¹TCID₅₀) 투여군에서는 약 70%의 항바이러스 효과를 관찰했다.

<77> 본 발명의 수용성 글루칸 올리고머는 아래와 같은 제형으로 투여할 수 있으며, 아래의 제제에는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 제한되는 것은 아니다.

<78> 제제예 1. 주사제제의 제조

<79> 실시예 3의 수용성 글루칸 올리고머.....100 mg

<80> 소듐 메타비설파이트.....3.0 mg

<81> 메틸파라벤.....0.8 mg

<82> 프로필파라벤.....0.1 mg

<83> 주사용 멸균증류수.....적량

<84> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 방법으로 최종 부피가 2ml이 되도록 제조한 후, 2ml 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조한다.

<85> 제제예 2. 정제의 제조

<86> 실시예 3의 수용성 글루칸 올리고머.....200 mg

<87> 유당.....100 mg

<88> 전분.....100 mg

<89> 스테아린산 마그네슘.....적량

<90> 통상의 정제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 타정하여 정제를 제조한다.

<91> 제제예 3. 캡슐제의 제조

<92> 실시예 3의 수용성 글루칸 올리고머.....100 mg

<93> 유당.....50 mg

<94> 전분.....50 mg

<95> 탈크.....2 mg

<96> 스테아린산마그네슘.....적량

<97> 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

<98> 제제예 4. 액제의 제조

<99> 실시예 3의 수용성 글루칸 올리고머.....1000 mg

<100> 설탕.....20 g

<101> 이성화당.....20 g

<102> 레몬향.....적량

<103> 정제수를 가하여 전체 1000ml로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.

<104> 제제예 5. 건강식품의 제조

<105> 실시예 3의 수용성 글루칸 올리고머.....1000 mg

<106> 비타민 혼합물.....적량

<107> 비타민 A 아세테이트.....70 μ g

<108> 비타민 E.....1.0 mg

<109> 비타민 B1.....0.13 mg

<110> 비타민 B2.....0.15 mg

<111> 비타민 B6.....0.5 mg

<112> 비타민 B12.....0.2 μ g

<113> 비타민 C.....10 mg

<114> 비오틴.....10 μ g

<115> 니코틴산아미드.....1.7 mg

<116>	엽산.....	50 μ g
<117>	판토텐산 칼슘.....	0.5 mg
<118>	무기질 혼합물.....	적량
<119>	황산제1철.....	1.75 mg
<120>	산화아연.....	0.82 mg
<121>	탄산마그네슘.....	25.3 mg
<122>	제1인산칼륨.....	15 mg
<123>	제2인산칼슘.....	55 mg
<124>	구연산칼륨.....	90 mg
<125>	탄산칼슘.....	100 mg
<126>	염화마그네슘.....	24.8 mg

<127> 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

<128> 제제예 6. 건강 음료의 제조

<129>	실시예 3의 수용성 글루칸 올리고머.....	1000 mg
<130>	구연산.....	1000 mg
<131>	올리고당.....	100 g

<132> 매실농축액.....2 g

<133> 타우린.....1 g

<134> 정제수를 가하여 전체.....900 ml

<135> 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

<136> 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

【발명의 효과】

<137> 상기와 같이 효모변이주 IS2 세포벽 유래의 불용성 베타 글루칸을 상업적 사용이 가능한 베타 글루칸 분해효소를 처리하여 분자량이 1,000에서 10,000사이의 수용성 글루칸 올리고머를 생산하였으며, 생산된 수용성 글루칸 올리고머가 돼지 독감 인플루엔자 바이러스 및 돼지 전염성 위장염 코로나 바이러스 억제 활성화에 탁월한 효능을 보임을 확인하여, 본 발명의 수용성 글루칸 올리고머는 전염성 바이러스와 관련된 질환 및 독감 예방 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

효모 IS2 (KCTC 0959BP) 유래 수용성 글루칸 올리고머를 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스로 인한 질환 및 코로나바이러스로 인한 질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 인플루엔자 바이러스는 A형, B형, C₄형 인플루엔자 바이러스 또는 돼지인플루엔자 바이러스인 약학조성물.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스로 인한 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염 또는 폐렴인 약학조성물.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 코로나 바이러스로 인한 질환은 감기, 중증 급성 호흡기 질환, 급성유행성설사 또는 전염성 위장염인 약학조성물.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 질환은 사람을 포함한 포유동물에 발생하는 질환인 약학조성물.

【청구항 6】

독감 인플루엔자 및 코로나 바이러스에 의한 질환의 예방 또는 개선을 위한 효모 IS2 (KCTC 0959BP) 유래 수용성 글루칸 올리고머 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 건강기능식품.

【도면】

